

OTKA szakmai zárójelentés - D 048459

2004. október 1. – 2006. január 31.

2007. február 1. – 2007. szeptember 30.

**Biológiai makromolekulák statikus és dinamikus szerkezetvizsgálata
multinukleáris, multidimenzionális NMR spektroszkópia segítségével**

Dr. Bodor Andrea

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet

A megvalósítandó munkatervem célkitűzései kétirányúak voltak: (a) a fehérjekutatásban általam eddig nem használt NMR spektroszkópai mérés technikák megtanulása, adaptálása, illetve (b) ezen és a klasszikusnak számító impulzusszekvenciák alkalmazása adott fehérje, vagy fehérje-ligandum rendszerek szerkezeti és dinamikai vizsgálatánál. Korábbi szakmai tapasztalataim kiegészítve megismerkedtem a híg oldatban jelenlévő nagy molekulák tanulmányozásánál használt impulzusszekvenciákkal: a különféle vízelnyomós technikákkal készült két-dimenziós homonukleáris korrelációs TOCSY, NOESY, ROESY, valamint heteronukleáris HSQC mérésekkel. Nagy méretű fehérjéknél a jelazonosításhoz szükséges három-dimenziós HNCA, HNCOCA, CCONH méréseket futtattam, illetve a gerinc mozgásának jellemzéséhez T_1 , T_2 relaxációs időmeghatározást, heteronukleáris NOE méréseket végeztem. A fehérje-peptid kölcsönhatás tanulmányozásához STD (Saturation Transfer Difference) mérésekre volt szükség, illetve a makromolekula méretének ellenőrzésére DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) technikához.

Munkám a multinukleáris, multidimenzionális NMR spektroszkópia sokrétű alkalmazási lehetőségét aknázza ki a peptidek, fehérjék vizsgálatában.

A tanulmányozott rendszerek három csoportra oszthatóak: a) 6-10 aminosavból álló nyíltláncú, illetve ciklikus peptidek vizsgálata DMSO, és vizes közegben; b) egy homodimer, 178 aminosavmaradékot tartalmazó fehérje jelazonosítása, fehérje peptid kölcsönhatás tanulmányozása mind a fehérje, mind a peptid oldaláról, c) ^{31}P NMR spektroszkópia alkalmazása egy enzimkatalizált folyamat mechanizmusának jellemzésére. Ezen rendszereket természetesen más megközelítésben is vizsgálják, az NMRes mérések elvégzése, kiértékelése, a jelenségek magyarázata volt az én feladatom.

a1) Bizonyos tüdőrákos (ún. SCLC: Short Cell Lung Carcinoma) sejtek proliferációját gátló, aromás oldalláncot tartalmazó rövid peptidek és peptidanalógok oldatszerkezetét jellemeztem. Biológiai kutatások kimutatták, hogy a receptorhoz való kötődéshez és az aktivitás eléréséhez elégséges egy 4-6 aminosavból álló peptid, melynek jellegzetes szekvenciája: Xxx-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Leu, azaz Xxx-SP5 (ahol Xxx: Phe, Tyr, DArg). Jobb, vagy hasonló IC₅₀ értéket (50%-os gátlási érték μM -ban) szolgáltatnak a C-terminális végen levő AMB (1-amino 3-metil bután) védőcsoportot tartalmazó analógok. Ezek vízben kevésbé, ám DMSO-ban jól oldódó vegyületek. A felsorolt molekulák teljes ^1H jelazonosítását elvégeztem. A lehetséges oldatszerkezet meghatározásához távolság jellegű kényszerfeltételeket gyűjtöttem a 2D NOESY spektrumokból. Elég kevés ilyen feltétel

állapítható meg, ezek is kizárólag szekvenciális és egy aminosavon belüli NOE kölcsönhatások eredményeképpen lépnek fel. Az egymástól távolabb lévő aminosavak között nem azonosítható kölcsönhatás. Következésképp a peptidek DMSO közegben nem rendelkeznek egyetlen meghatározott térszerkezettel, hanem vélhetőleg konformerek sokasága formájában vannak jelen. Az SP5 analógok láncvégei mobilisabbak, ott NOE kölcsönhatás nem detektálható. A középső - valamennyire merev - rész felelős a receptorhoz való kötődésért, így következő lépésként a peptidanalóg és a receptor max. 150 aminosavból álló N-terminális vége közötti kölcsönhatás kell elvégezni.

Eredményeinkből 1 kézirat született:

A. Orosz, A. Szabó, G. Szeman, T. Janáky, Cs. Somlai, B. Penke, A. Bodor, A. Perczel: *Novel nontoxic heat shock protein 90 inhibitors having selective antiproliferative effect; The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2006**, 38, 1352-1362.

a2) Korábbi kutatások azt mutatták, hogy a terapeutikusan aktív antitestek specifikusan az Alzheimer kórért (AD) felelős N-terminális A β (4-10) FRHDSGY epitóp szekvenciát célozzák meg. A felismerés specificitása és ezen epitóp, illetve ennek analóg, hosszabb, lineáris, vagy Cys-Cys kötéssel ciklizált változatainak tulajdonságai, oldatszerkezeti sajátosságai lehetővé teszik új, az AD kezelésére használható oltóanyagok fejlesztését. Két lineáris, és két ciklikus 8-13 aminosavmaradékból álló peptid teljes jelazonosítását végeztem el. Szobahőmérsékleten nem jelentkeznek NOESY keresztcsúcsok, ezért a szekvenciális aszignáció elvégzéséhez 285K-en futtatott ROESY mérések voltak szükségesek. Az gerinc NH protonok kémiai eltolódás változása hőmérséklet függvényében (az ábrázolt $\Delta\delta/\Delta T$ értékek alapján), illetve a $^3J_{\text{HNH}}$ csatolási állandók értékei mind azt mutatják, a vizsgált peptidek rendezetlenek (ún. random coil formában vannak jelen), nincs kitüntetett másodlagos szerkezetük. Molekulai dinamikai számítások alátámasztották, hogy az i és i+2, i+3 aminosavmaradékok közötti távolság 6Å-nél nagyobb, így érthető, hogy az NMR-es vizsgálatokban csak szekvenciális NOE keresztcsúcsok detektálhatóak.

Eredményeinkből 1 kézirat született, melyet most fogadtak el a J.Med.Chem. folyóiratban:

M. Manea, A. Kalászi, G. Mező, A. Bodor, A. Perczel, K. Horváti, A. Horváth, Ö. Farkas, M. Przybylski, F. Hudecz: *Antibody recognition and conformational flexibility of a plaque-specific β -amyloid epitope modulated by non-native peptide flanking regions.*

b) A DLC-t (dinein könnyű lánc) eredetileg a dinein motorfehérje alegységeként írták le, de kiderült, hogy az V-ös osztályba tartozó miozinhoz is kötődik. A DLC feltételezhetően mindkét motorfehérjén teher (cargo) - kötő és/vagy szabályozó funkciót lát el. Szerepe lehet a mikrotubuláris és az aktin filamentumok mentén történő intracelluláris transzport rendszer közötti "átkapcsolásban" is. A DLC-motor-kargo komplex kialakulásának szerkezeti alapja jelenleg még nem ismert, ennek felderítésére irányulnak kutatásaink. Első lépésben megvizsgáltam a miozin V peptid kötődését a 178 aminosavból álló homodimer ^{15}N jelölt DLC-hez. A HSQC mérések alapján 21 aminosavmaradék jele tolódik el jelentős mértékben, ezek a kötődésért felelős helyek. A ^{15}N , ^{13}C jelölt DLCn végzett 3D mérésekből származó aszignáció és az irodalomban a DLC-re vonatkozó adatok alapján a kötőhelyek a

szekvenciában a 60-71 közötti aminosavmaradék láncrészen helyezkednek el, melyek érdekessége, hogy csupán egyetlen aromás oldallánccal rendelkező aminosavat tartalmaznak, a többiek túlnyomórészt savas, vagy bázikus jellegűek. Az NMR titrálás során néhány jól elkülöníthető aminosavmaradék jelének térfogati integrálásával a K_d disszociációs állandó értékét is számolni lehet. Ezen eredmények alapján a peptid oldaláról is el kezdtem vizsgálni a kötőhelyeket. Azt a következtetést lehetett levonni, hogy a szabad állapotban rendezetlen peptid a kötődés során definiált szerkezetet mutat. Ezt kezdtem el bizonyítani egy hosszabb, 23 aminosavmaradékot tartalmazó, ¹⁵N-jelölt peptidláncon. Ehhez el kell végezni a szabad, illetve a peptid-fehérje komplex jeleinek azonosítását a megfelelő 3D spektrumok alapján. Elkezdtem a dinamikai paraméterek (T₁, T₂, heteronukleáris NOE) értelmezését is a szabad és a kötött formában egyaránt. A mérések kiértékelése folyamatban van.

Eredményeink a megjelent cikkünk alapján (Z. Hódi, A. L. Németh, L. Radnai, C. Hetényi, K. Schlett, A. Bodor, A. Perczel, L. Nyitray: Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein, Biochemistry, 2006, 45(41), 12582-12595.) egy újabb közleményben foglaljuk össze, melyet a Biochemistry folyóiratban szeretnénk közzéadni.

Az eredményeket poszter formájában 2005 július 3-8 Hollandiában megrendezett EUROMAR konferencián mutattam be, illetve előadásként 2005 júniusában, Balatonszemesen megrendezett Peptidkémiai konferencián ismertettem.

c1) A dUTPáz enzim hatásmechanizmusa biológiailag igen érdekes terület. A dUTPáz szerepe a szervezetben megakadályozni az uracil DNS-be való beépülését, mégpedig úgy, hogy elbontja a dUTP-t. A lejátszódó folyamat:



ahol PPi a pirofoszfát. Ez a reakció gyors ahhoz, hogy bármilyen módszerrel tanulmányozni lehessen, így a dUTP egy analógját, az α,β -imido-dUTP-t használtam. A nukleotidek vizsgálatához kézenfekvő a ³¹P NMR spektroszkópia, hiszen a foszfor atom kémiai eltolódása igen érzékeny a környezetében történő változásokra. Megállapítottam, hogy amennyiben a rendszerben jelen van Mg²⁺, a nukleofil támadás az α foszfor atomon történik. Mg²⁺ hiányában az a meglepő megfigyelés, hogy a támadás a β foszfor atomon következik be. Az időbeli követés kiértékelése során meghatároztam a folyamat pszeudo-elsőrendű sebességi állandóját. Megállapítható, hogy nagyon kis, szinte elhanyagolható mennyiségben valószínűsíthető intermedierek detektálhatóak, ezeket azonban csak röntgen kristallográfiás mérésekkel sikerült jellemezni.

Az eredményeinkből elkészült kézirat jelenleg beküldés alatt áll a Nature Struct. Mol. Biol. folyóiratba:

O. Barabás, V. Németh-Pongrácz, A. Bodor, A. Perczel, Z. Szabadka, V. Grolmusz, M. Wilmanns, B. G. Vértessy: Structural snapshots of dUTPase-catalysed phosphate ester hydrolysis directly visualize in-line attack and reaction intermediates.

Az eredményeket meghívott előadóként a 2007 szeptember 4-8 között Lengyelországban, Wrocławban megrendezett 2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences (2nd ECCLS) konferencián mutattam be.

c2) Bizonyos biológiai kísérletekben ortofoszforsavban történő több napos inkubáció, illetve az ortofoszforsav azonnali adagolása során a kimenetel ellentétes. A jelenség azzal lehetne magyarázható, hogy a foszforsav nagyon kismértékű, lassú dehidratációt szenved, pirofoszfát képződése mellett, melynek mennyisége az enzim koncentrációkkal összemérhető. Ennek eldöntésére ³¹P NMR méréseket végeztem kiforralt és nem kiforralt foszforsav oldatok esetén, pH =7,5 értéknél. A nem kiforralt mintában sikerült a foszforsav óriás intenzitású jele mellett kimutatni a 0,19 %-ben megjelenő pirofoszfátot, míg a kiforralt mintából ezen kémiai eltolódásnál a jel hiányzik.

Az elkészült kéziratot beküldtük a JBC folyóiratba, jelenleg referálás alatt áll:

M. Gyimesi, B. Kintses, A. Bodor, A. Perczel, S. Fischer, C. R. Bagshaw, A. Málnási-Csizmadia: The mechanism of the reverse recovery-stroke, phosphate release and actin activation of dictyostelium myosin II.

Az elnyert 3 éves posztdoktori ösztöndíjat 1 évre megszakítottam, viszont ez által hosszabbítást nem kaptam. Tanulmányúton Svédországban, a Stockholms Universitet Biofizika tanszékén voltam, ahol egy új tématerülettel kezdtem el foglalkozni: a membránfehérjék családjába tartozó feszültség függő K⁺ csatorna egyik doménjének szerkezetét, membránban történő elhelyezkedését tanulmányoztam. Illetve kitérőt tettem a molekuláris biológia területére, mivel a ¹⁵N jelölt fehérjét is elő kellett állítani. A téma és az ottani csoporttal való kapcsolat máig megvan, egy magyar-svéd együttműködés megteremtésén dolgozunk.